Gebrauchsanweisung für Biofortuna SSPGo™ HLA Typisierungskits
CE-Revision 5, Januar 2014

1. Verwendungszweck

Biofortuna HLA SSPGo Kits sind qualitative DNA-basierte Kits zur Bestimmung von HLA-Allelen in Kits mit 'niedriger Auflösung' oder zur gruppenspezifischen Amplifikation von Allelen in Kits mit 'mittlerer' Auflösung. Als allgemeine Definition für eine mittlere Auflösung gilt, dass die meisten Ergebnisse mit einer zweistelligen Nummer eindeutig definiert werden; z. B. DQB1*02, DQB1*05, etc. Als allgemeine Definition für eine hohe Auflösung gilt, dass die meisten Allele mit vierstelligen Nummern definiert werden, wie z. B. DQB1*02:01, DQB1*05:01, etc. Dieses Produkt ist ein In-vitro-Diagnostikum, das nur zur Verwendung durch qualifiziertes Fachpersonal vorgesehen ist.

2. Einführung

HLA-Moleküle spielen eine zentrale Rolle für die Immunität sowie die Selbst- und Fremderkennung. Daher sind bei den meisten Transplantationsarten zuvor eine HLA-Genotypisierung und ein HLA-Matching zwingend notwendig. Da HLA-Antigene die Spezifität von T-Zell-vermittelten Immunantworten einschränken, ist die HLA-Genotypisierung ein nützliches Instrument bei der Untersuchung von Immunstörungen oder der Immunantwort auf Krankheitserreger, Impfungen oder medizinische Behandlungen. Darüber hinaus kann die HLA-Genotypisierung als Hilfsmittel bei der Diagnose von Krankheiten verwendet werden, bei denen bestimmte HLA-Allele maßgeblich mit dem Krankheitszustand im Zusammenhang stehen.

Die meisten HLA-Gene sind hochgradig polymorph, weshalb zur richtigen Bestimmung von HLA-Antigenen in der Regel eine DNA-Genotypisierung erforderlich ist. Die PCR-Genotypisierung mittels sequenzspezifischer Primer (SSP)[1] ist eine schnelle Methode zur HLA-Genotypisierung, die insbesondere für Situationen geeignet ist, in denen eine mittlere Auflösung erforderlich ist. Alle Biofortuna SSP-Kits beinhalten komplette Reaktionsmischungen in trockener Form, einschließlich Polymerase, sodass der Benutzer vor der PCR lediglich die DNA hinzufügen muss.

Es wird alles unternommen, um die Kits gemäß den neuen IMGT-Veröffentlichungen zu HLA-Alignments auf dem aktuellen Stand zu halten. Aktualisierungen des Kits finden Sie unter www.biofortuna.com.

3. Erläuterung des Tests

Die SSP-PCR basiert darauf, dass nur Primer mit einem exakt an eine Zielsequenz passenden 3'-Ende amplifizieren. Mit nicht passenden Primern lassen sich keine positiven Amplifikationsprodukte erzeugen[2]. Ein Primerpaar der internen Kontrolle, das eine konservierte Region eines Housekeeping-Gens amplifiziert, ist in jeder PCR-Reaktionsmischung enthalten; das Primerpaar der internen Kontrolle ist ein Indikator für die Integrität der PCR-Reaktion. Bei der SSP-Genotypisierung werden in der Regel mehrere Reaktionen verwendet, die, wenn sie zusammen analysiert werden, den Genotyp anzeigen. Die Visualisierung der Amplifikationsprodukte kann mittels Agarosegel-Elektrophorese-Geräten erreicht werden, die die DNA-Fragmente nach ihrer Größe trennen.

4. Inhalt des Kits

- PCR-Platten oder PCR-Streifen aus Polypropylen mit 8 bis 96 PCR-Vertiefungen (je nach Kit); jede Vertiefung enthält vorpipettierte gefriergetrocknete Primer, Polymerase, dNTPs* und Puffer. Alle Platten oder Streifen werden mit Abdichtungsfolien oder -verschlüssen versiegelt einzeln verpackt in einem Folienbeutel mit einem Antikondensationsbeutel geliefert.
- PCR-Abdichtungsfolien und -verschlüsse
- 1 Gebrauchsanweisung.
- Analysenzertifikat
- Interpretationstabellen und Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets, MSDS) können von der Biofortuna Internetseite www.biofortuna.com heruntergeladen werden. Sollte das Herunterladen nicht möglich sein, wenden Sie sich bitte an Ihren zuständigen Kundendienst.

*CleanAmp™ dNTPs stehen unter der Lizenz von Trilink Biotechnologies Inc zur Verwendung in Biofortuna SSPGo Produkten.

5. Nicht mitgelieferte Reagenzien und Laborausstattung

- Geeignete kalibrierte Pipetten und sterile Pipettenspitzen, z. B. P10-Pipette mit 10-µl-Filterspitzen.
- DNA-Isolierungskit/-materialien.
- UV-Spektralphotometer.
- Polypropylen-Röhrchen.
- Steriles Wasser (Molecular Grade).
-
- Ein Thermozylinder mit den folgenden Spezifikationen sollte verwendet werden:
  - 96-Well-Thermocycler mit beheiztem Deckel mit einer Temperatur von 104 °C für ölfreien Betrieb
  - Temperaturerhöhungsgeschwindigkeit 1,0 °C pro Sekunde
  - Temperaturbereich 4,0 °C bis 99,9 °C
  - Temperaturgenauigkeit ±0,25 °C im Bereich von 35 °C bis 99,9 °C
  - Temperaturkalibration rückführbar auf Referenzstandard
  - Thermozylinder anhand der nachstehend in Abschnitt 8 aufgeführten PCR-Parameter programmieren.

  Hinweis: Eine vollständige Gebrauchsanweisung zum Thermocycler entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des Herstellers. Thermocycler sollten gemäß den Akkreditierungsrichtlinien der "American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI)" oder "European Federation of Immunogenetics (EFI)" kalibriert werden.

- Gelelektrophorese-Reagenzien (Agarose, 0,5x TBE, DNA-Molekulargewichtsmarker (1.000 bp), 10 mg/ml Ethidiumbromid).
- Gelelektrophorese-Ausrüstung (Geltanks, Netzanschluss, Geldokumentations-System mit UV-Transilluminator).
- Software in der manuellen Analyse von SSPGo Kit Testergebnisse und die Archivierung von Daten unterstützen kann von der Website Biofortuna www.biofortuna.com heruntergeladen werden.

Hinweis: Alle Veränderungen der vorgegebenen Bedingungen wie z. B. Andere Temperaturerhöhungsgeschwindigkeiten können die Interpretation der Testergebnisse beeinflussen.

6. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- Zur Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Die Tests sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt werden.
- Alle Typisierungsergebnisse sollten von qualifiziertem Fachpersonal überprüft werden. Für eine klinische Entscheidung sollten die Ergebnisse darüber hinaus mit einem anderen Typisierungsverfahren bestätigt werden.
- Alle Reagenzien gemäß den Richtlinien der guten Laborpraxis handhaben.

- Den prä-PCR-Bereich vom post-PCR-Bereich trennen. Keine Materialien vom post-PCR-Bereich zurück in den prä-PCR-Bereich bringen.
- **Biogefährdung:** Alle Blutprodukte als potentiell infektiös behandeln.
- **Biogefährdung:** Ethidiumbromid ist potentiell karzinogen. Bei der Verwendung stets Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen.
- **Biogefährdung:** Vorsicht beim Umgang mit UV-Quellen - stets Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen. Nie direkt in das UV-Licht schauen.
- Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets) finden Sie unter www.biofortuna.com.

7. Lagerung und Haltbarkeit

Biofortuna SSPGo Kits sollten bei 2 - 28 °C gelagert werden. Sobald PCR-Gefäße aus den Folienbeuteln entnommen wurden, sollten die Reagenzien innerhalb von 3 Stunden mit DNA rehydratisiert werden. Das Verfallsdatum entnehmen Sie bitte der Verpackung. Die Produkte nicht über das aufgedruckte Datum hinaus verwenden.

Die Kits nicht verwenden, wenn der Folienbeutel gerissen ist, Löcher aufweist oder keinen Antikondensationsbeutel enthält.
Mithilfe der im Lieferumfang enthaltenen Abdichtungsfolien und Verschlüssen sicherstellen, dass die PCR-Gefäße nach Zugabe von DNA dicht verschlossen sind, da andernfalls während der PCR-Amplifikation Verdunstung auftreten kann. Dabei insbesondere auf die Ränder und Ecken achten.

Hinweis (1): Bei Bedarf können nicht hydrierte PCR-Platten und –Streifen vor dem Hinzufügen von DNA bei einer Raumtemperatur bis zu 21 °C und einer Feuchtigkeit unter 60 % bis zu 3 Stunden außerhalb des Folienbeutels aufbewahrt werden.

Hinweis (2): Nach dem Befeuchten mit DNA können aus frisch geöffneten Beuteln entnommene PCR-Streifen und –Platten vor der PCR bis zu 24 Stunden bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden, vorausgesetzt, die Gefäße werden gut versiegelt, um ein Verdunsten zu verhindern.

8. Anweisungen zur Verwendung

Anforderungen an DNA-Proben

Jede Reaktion im Test wurde für die Verwendung von 50 - 100 ng DNA optimiert. Jede Reaktion sollte jedoch unbedingt mit exakt 10 µl Flüssigkeit rehydratisiert werden. Daher kann der Test nur mit 10 µl DNA bei 5 - 10 ng/µl durchgeführt werden. Die DNA nur mit sterilem, hochreinem Wasser zur erforderten Konzentration verdünnen.

Achtung: Die erzeugte DNA-Probe darf höchstens 2,5 mM Tris/0,25 mM EDTA enthalten. Nur aus Zitrat extrahierte oder in EDTA vorbereitete DNA verwenden. Da Heparin die PCR hemmen kann, sollte keine DNA aus heparinisierten Blutproben extrahiert werden. Es ist erwiesen, dass Hämoglobinkonzentrationen von mehr als 1 mg/dl in den DNA-Proben SSPGo HLA-Kits beeinflussen.

Die DNA kann mit allen herkömmlichen Methoden extrahiert werden. Bitte sicherstellen, dass der $OD_{260/280}$ der DNA-Probe bei der Messung durch UV-Spektralphotometrie zwischen 1,66 und 1,94 liegt.

Prä-PCR - Anweisungen

i. Eine(n) SSPGo Platte oder Streifen aus einem verschlossenen Beutel nehmen.
ii. Chargenbezeichnung des Assays notieren.
iii. Achten Sie vor dem Entfernen der Folie bzw. des Verschlusses darauf, dass sich alle gefriergetrockneten Pellets (PCR-Reagenzien) unten in der Platte bzw. dem Röhrchen befinden. Klopfen Sie andernfalls vorsichtig gegen das Gefäß, damit sich die Pellets absenken.

Bitte beachten Sie, dass die erste Reaktion jedes Test-Abschnitts im Gegensatz zum restlichen Kit immer hellrosa (bzw. im hydrierten Zustand rot) ist. Einige PCR-Platten enthalten eine violett gefärbte Negativkontrolle (Kontrolle ohne Template) in der letzten Vertiefung der Platte.

iv. Mit einer sterilen Pipette 10 µl DNA-Lösung in jede Vertiefung der Platte bzw. des Streifens pipettieren. Siehe hierzu den Hinweis in Abschnitt 8 zu Anforderungen an DNA-Proben. Wenn die Platte eine violett gefärbte, integrierte Negativkontrolle enthält, 10 µl Probenverdünnungsmittel (ohne DNA) hinzupipettieren. Siehe Hinweis zur Negativkontrolle in Abschnitt 8.

v. Sicherstellen, dass die Trockenreagenzien in jeder Vertiefung vor dem Thermocycler-Schritt mit der DNA in Berührung kommen.

vi. Die Reaktionsgefäße mit der mitgelieferten Abdichtungsfolie oder den PCR-Röhrchenverschlüssen verschließen. Sicherstellen, dass die Reaktionsgefäße möglichst dicht verschlossen sind, um eine Verdunstung zu verhindern. Dabei insbesondere auf die Ränder und Ecken achten.

vii. Die Platte bzw. Streifen direkt in den Thermocycler geben. Sicherstellen, dass die Gefäße vollständig im Block eingesetzt sind und der Deckel vollständig geschlossen ist. Anderenfalls kann es in einzelnen Fällen durch Verdunsten oder Kondensieren zu einer fehlerhaften PCR kommen.

viii. PCR-Programm durchführen (siehe "PCR-Parameter"*)*.

HINWEIS ZUR RESUSPENSION: Nach der Entnahme der PCR-Gefäße aus dem Folienbeutel sollten die Reagenzien zügig mit DNA hydriert werden. Weitere Informationen entnehmen Sie bitte Hinweis (1) und Hinweis (2).

HINWEIS ZUR NEGATIVKONTROLLE: Einige Kits enthalten eine Negativkontrolle (NTC - No Template Control) als letzte Reaktion in der Platte. Diese Reaktionsmischung enthält einen violetten Farbstoff zur Unterscheidung von den restlichen Reaktionen. Die NTC dient zur Erkennung einer PCR-Kontamination oder einer Kontamination durch genomische DNA, die im Wasser enthalten sein kann, das zur Resuspension der DNA verwendet wurde. Liegt eine PCR-Kontamination vor, werden Amplifikate unterschiedlicher Größe festgestellt.

HINWEIS ZUR HÖHE DER PCR-PLATTE/STREIFEN: Es wird empfohlen, dass die Platten und Streifen dieselbe Höhe aufweisen, wenn sie im selben PCR-Gerät verwendet werden. Bei unterschiedlicher Höhe kann es zu unzureichendem Kontakt mit dem beheizten Deckel des PCR-Gerätes kommen. Dies kann zu einer schwachen oder fehlerhaften PCR-Amplifikation führen.

PCR-Parameter

Die folgenden PCR-Parameter sollten verwendet werden. Sicherstellen, dass die Temperaturerhöhungs-geschwindigkeit (ramp speed) 1 °C pro Sekunde beträgt, und den beheizten Deckel aktivieren. Eine vollständige Gebrauchsanweisung zum Thermocycler entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des Herstellers. Thermocycler sollten gemäß den Akkreditierungsrichtlinien der "American Society of Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI)" oder "European Federation of Immunogenetics (EFI)" kalibriert werden.

Denaturierung	94°C	5 Minuten	
Denaturierung	96°C	15 Sekunden	←
Anlagerung	66°C	50 Sekunden	10 Zyklen
Extension	72°C	30 Sekunden	
Denaturierung	96°C	15 Sekunden	←
Anlagerung	64°C	50 Sekunden	20 Zyklen
Extension	72°C	30 Sekunden	

HALTEN Bei mindestens 15 °C höchstens 72 Stunden vor dem Laufen der Gels. Bei Bedarf kann die PCR-Platte vor dem Laufen der Gels bis zu 24 Stunden bei 2 bis 8 °C aufbewahrt werden. Die Platten müssen stets gut verschlossen sein.

Gelelektrophorese

Diese Anweisungen gelten für die horizontale Agarose-Gelelektrophorese: Ein 2%iges Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer herstellen. Wenn das Gel bis auf ca. 60 °C abgekühlt ist, Ethidiumbromid in einer End-Konzentration von 0,5 µg/ml zugeben. Das Gel gießen und Kämme im Mikrotiter-Format einsetzen (z. B. 12x8 Vertiefungen mit 9 mm Abstand). Sobald das Gel erstarrt ist, die Kämme entnehmen und das Gel in 0,5x TBE-Puffer legen. Das Gel muss vollständig bedeckt sein. Das gesamte PCR-Produkt in Sequenz in das 2%ige Agarosegel laden und die Position jeder Reaktion notieren. Zur Größenbestimmung wird eine 1000-bp-Leiter empfohlen. Das Gel 20 Minuten bei 10 V/cm laufen lassen.

Genaue Angaben zur Ausrüstung entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung des Herstellers Ihres Elektrophorese-Gerätes. Die Betrachtung des Gels sollte mit einem UV-Geldokumentations-System mit UV-Transilluminator erfolgen.

Hinweis: Unzureichende Elektrophorese kann in der Vermischung großer Amplifikate (über 600 bp) mit den Kontroll-Amplifikaten resultieren. Bitte vergewissern Sie sich, dass die Elektrophorese in der Lage ist, derartige Amplifikate darzustellen. Bei zu langer Elektrophorese können kleine Amplifikate in die vorhergehenden Vertiefungen eines Gels verloren gehen.

9. Interpretation

SSPGo Kits sind so konzipiert, dass die Ergebnisse manuell anhand von Interpretationstabellen, die Sie unter www.biofortuna.com finden, bestimmt werden können. Wenn Sie Probleme beim Zugriff auf die Internetseite haben, wenden Sie sich bitte an Ihren zuständigen Kundendienst.

Die Interpretationstabellen können spezifische, für die Interpretation relevante Hinweise enthalten.

Das Gelfoto unter Berücksichtigung der passenden Kit- und Chargennummern an das entsprechende Interpretationsformular heften. Das Gelbild untersuchen. Jede Reaktion sollte eine positive Kontrollbande enthalten. Hierzu die Interpretationstabellen zu Hilfe nehmen, da bei verschiedenen SSPGo Produkten die Größe unterschiedlich sein kann. Interne Kontrollbanden können wesentlich schwächer erscheinen, wenn allelspezifische Banden vorhanden sind. Ist eine allelspezifische Bande, jedoch keine Kontrollbande vorhanden, sollte dies dennoch als positives Ergebnis betrachtet werden. Alle Banden unter 70 bp ignorieren, da es sich hierbei um freie Primer handelt.

Die positiven Reaktionen bestimmen. Positive Reaktionen sind durch Banden in erwarteter Größe gekennzeichnet, wie in den Interpretationstabellen angegeben. Beachten Sie, dass in einer bestimmten Reaktion mehr als eine Produktgröße vorliegen kann – hierbei handelt es sich um Multiplexreaktionen, die in den Interpretationstabellen angegeben sind.

Die positiven Reaktionen mit den Interpretationstabellen vergleichen. Ein positives Ergebnis in einer Reaktion deutet darauf hin, dass mindestens eines der Allele vorhanden ist, die in der Interpretationstabelle hierzu angegeben sind. Jedes beliebige Allel kann in mehreren Röhrchen amplifiziert sein – ist das Allel vorhanden, sollte in allen relevanten Reaktionen eine positive Reaktion vorliegen.

Abb. 1 Beispiele für positive Reaktionen, gekennzeichnet durch vorhandene allelspezifische Banden und Kontrollbanden (Reaktionen 1 - 3); negative Reaktionen, gekennzeichnet durch vorhandene Kontrollbanden und nicht vorhandene allelspezifische Banden (Reaktionen 4 - 7); sowie eine fehlgeschlagene Reaktion, gekennzeichnet durch nicht vorhandene Banden (Reaktion 8).

Stellen Sie sicher, dass die Chargennummer des Kits zu der Chargennummer in der Interpretationstabelle passt.

Software in der manuellen Analyse von SSPGo Kit Testergebnisse und die Archivierung von Daten unterstützen kann von der Website Biofortuna www.biofortuna.com heruntergeladen werden.

10. Qualitätssicherung und -kontrolle

Bevor Biofortuna ein Produkt versendet, wird für jede Charge SSPGo eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Aus jeder Kitcharge werden Proben gegen ein festgelegtes Panel mit humanen DNA-Proben getestet, um die ordnungsgemäße Leistung sicherzustellen. Jede Reaktion wurde gegen mindestens 47 DNA-Proben aus einer gut charakterisierten Zelllinie validiert. Biofortuna empfiehlt allen Labors, für alle neuen Typisierungsprodukte vor der Verwendung mit klinischen Proben eine interne Validierung durchzuführen. Die diagnostische Typisierung sollte nur von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt und die Ergebnisse von einem anderen qualifizierten Mitarbeiter überprüft werden.

11. Klinische Daten

Die Leistung des SSPGo HLA-Typisierungskits wurde in einer in fünf Prüfzentren durchgeführten In-vitro-Diagnostikastudie mit dem Diagnostikum 'One Lambda' Labtype SSO verglichen. Die im Rahmen der SSPGo-Prüfung durchgeführte Locus-Typisierung lieferte Testergebnisse für HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1/3/4/5, HLA-DPB1, DPA1 und HLA-DQA1*05, DQB1*02, DQ8.

Die klinische Wirksamkeit der SSPGo HLA-Typisierungskits zeigt eine 98,3 - 100%ige Übereinstimmung mit dem Vorgängerprodukt (SSO-Verfahren) mit nicht weniger als 95% Konfidenz der Genotypisierung der getesteten HLA-Allele der Klasse I und II aus DNA, die aus 5-10 ng/µl Vollblut gewonnen wurde.

Unter Ausschluss dreier (3) bestätigter nicht übereinstimmender Genotypisierungsergebnisse wurde 100% Übereinstimmung bei 1.222 Proben für 3 Chargen jeden Testkists in den klinischen Prüfzentren in den USA und Großbritannien erzielt.

Die Reproduzierbarkeit der SSPGo HLA-Typisierungskits von Prüfzentrum zu Prüfzentrum wurde an drei Prüfzentren anhand eines repräsentativen Panels von 8 SSPGo PCR-Reaktionen gegen die mit 4 ng/µl und 11 ng/µl (den unteren und oberen Grenzen des Testkit-Konzentrationsbereichs) formulierten gelieferten DNA-Proben geprüft. Eine Gesamtanzahl von 958/960 gleichmäßig über die drei externen Prüfzentren verteilten Einzelreaktionen war konkordant zu den DNA-Proben, was insgesamt in einer Übereinstimmung von 99,7 % (0,995 LCL) resultierte.

Die Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge wurde anhand dreier Chargen eines repräsentativen SSPGo HLA-Testkits von einem einzigen Prüfzentrum/Betreiber in einem DNA-Konzentrationsbereich von 5 - 10 ng/µL geprüft. Die Prüfung der Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge für die SSPGo HLA-Typisierung ergab bei insgesamt 390 Tests von 130/130 DNA-Proben eine 100%ige Übereinstimmung zum Vorgängermodell für die drei (3) geprüften Chargen des repräsentativen SSPGo HLA-Testkits.

Konkordante SSPGo HLA-positive Bestätigung wurde für Allele der Klasse I und Klasse II in Vergleichstests mit LABTyp SSO getesteten klinischen Proben erhalten. Eine interne SSPGo HLA Prüfung lieferte übereinstimmende Ergebnisse zu DNA-Referenzproben, außer bei nicht verfügbaren Proben für bestimmte seltene HLA-DPB1 Allele und seltene HLA-B Allele sowie Allelegruppen wie B*59:01, B*78 und B*83:01. Die folgenden seltenen Allelegruppen konnten nicht bestätigt werden:

B*59, B*78, B*83, DPB*21:01, DPB*26:01:02, DPB*27:01, DPB*28:01, DPB*29:01, DPB*31:01, DPB*34:01, DPB*35:01:01, DPB*39:01, DPB*45:1, DPB*46:01, DPB*51:01, DPB*55:01, DPB*59:01, DPB*63:01, DPB*81:01, DPB*85:01 & DPB*105:01

12. Literatur

1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

13. SSPGo Anleitung zur Fehlersuche

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Lösung
Keine Amplifikation im Reaktionsgefäß	Falsche DNA-Konzentration verwendet	Die DNA-Menge durch Messung bei OD_{280} bestimmen und sicherstellen, dass pro Reaktion insgesamt 50 - 100 ng DNA in einem Volumen von 10 µl zugegeben wurde.
	DNA-Probe enthält PCR-Inhibitoren	Kein heparinisiertes Blut verwenden. DNA-Proben mit mehr als 1 mg/dl Hämoglobin vermeiden.
	Schlechte Qualität der verwendeten DNA-Probe	Die DNA-Qualität bestimmen. Das $OD_{260/280}$ -Verhältnis sollte gemäß UV-Spektralphotometrie 1,69 – 1,94 betragen. Sicherstellen, dass die DNA vor der Verwendung vollständig in der Lösung resuspendiert ist. Sicherstellen, dass die DNA-Probe mit hochreinem Wasser verdünnt wurde und höchstens 2,5 mM Tris/0,25 mM EDTA enthält.
	Reagenzien sind nicht vollständig resuspendiert	Sicherstellen, dass die Pellets nach Zugabe der DNA vollständig rehydratisiert sind. Sicherstellen, dass pro Reaktion 10 µl DNA-Lösung verwendet werden.
	Thermocycler ist nicht richtig eingestellt	Sicherstellen, dass das PCR-Programm gemäß der Gebrauchsanweisung richtig eingegeben wurde. Sicherstellen, dass der beheizte Deckel des Thermocyclers aktiviert und ausreichend fest verschlossen ist. Weitere Informationen entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung zum Thermocycler.
	Probleme bei der Elektrophorese	Sicherstellen, dass der Elektrophoresetank mit Strom versorgt wird – das Netzteil überprüfen und die Elektroden reinigen. Das Gel in 0,5X TBE-Puffer laufen lassen. Sicherstellen, dass 0,5 µg/ml frisches Ethidiumbromid verwendet wird. Überprüfen, dass bei der Betrachtung des Gels eine ausreichende UV-Beleuchtung gegeben ist. Weitere Informationen zum Geltank und zum Netzteil entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung des Herstellers.

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Lösung
	Platten nicht richtig verschlossen.	Unzureichend verschlossene Platten können während der PCR zu Verdunstung führen. Biofortuna liefert die empfohlene Abdichtungsfolien mit dem Kit. Zusätzliche Folien sind im Handel erhältlich. Sicherstellen, dass alle Vertiefungen ausreichend abgedeckt und verschlossen sind. Achten Sie dabei besonders auf die Vertiefungen in der Nähe der Ränder der PCR-Platten bzw. Streifen.
Einzelne Ausfälle bei allelspezifischen oder Kontroll-Amplifikaten.	Gelfehler	Sicherstellen, dass alle Vertiefungen in der richtigen Reihenfolge auf das Gel geladen wurden, und dass in jede Vertiefung dasselbe Volumen an PCR-Reaktion gegeben wurde. Die Pipetten gemäß den Anweisungen des Herstellers kalibrieren. Überprüfen, dass die Vertiefungen im Gel korrekt geformt sind. Beim Entfernen der Kämme vorsichtig vorgehen, da ansonsten unter Umständen der Boden der Vertiefungen reißen kann. Sicherstellen, dass sich die Agarose vor dem Gießen des Gels vollständig aufgelöst hat. Sicherstellen, dass das Gel nicht zu lange laufen gelassen wird, da kleinere Amplifikate aus dem Gel herauswandern können. Sicherstellen, dass das Gel lange genug laufen gelassen wurde, um die Trennung der Banden zu ermöglichen. Frische Ethidiumbromid-Lösung verwenden.
	Probleme mit dem Thermocycler	Fehler können insbesondere im Randbereich des Assays dadurch auftreten, dass der Deckel nicht fest genug verschlossen wurde. Dies kann auf halber Höhe der PCR-Vertiefung zu Verdunstung und Kondensation der PCR-Reaktion führen und ein Fehlschlagen der PCR verursachen. Bitte unbedingt die Anweisungen des Herstellers zur Wartung und Kalibrierung des Thermocyclers befolgen. Überprüfen, dass die PCR-Parameter gemäß der Gebrauchsanweisung richtig sind.
	Probleme aufgrund von Verdunstung	Sicherstellen, dass alle Vertiefungen ausreichend abgedeckt und verschlossen sind. Achten Sie dabei besonders auf die Vertiefungen in der Nähe der Ränder der PCR-Platten bzw. Streifen.

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Lösung
		Sicherstellen, dass der beheizte Deckel aktiviert ist und ausreichend Kompressionsdruck vom Deckel ausgeht. Nur die mitgelieferten Biofortuna-Abdichtungsfolienverwenden. Zusätzliche Folien sind im Handel erhältlich.
	Vereinzelt auftretende Fehler aufgrund von Problemen mit der DNA	Keine DNA vorhanden: Sicherstellen, dass in allen Vertiefungen DNA vorhanden ist. Falsches Volumen: Sicherstellen, dass zu jeder Reaktion 10 µl DNA-Lösung hinzugefügt wurden. Zu hohe Menge an DNA hinzugefügt: Bei einer Konzentration von über 200 ng oder unter 20 ng kann es zu einer fehlerhaften PCR kommen. Durch Verunreinigungen in der DNA kann es vereinzelt oder in verstärktem Maße zu fehlgeschlagenen Amplifikationen kommen.
Verschmiertes Gelbild	DNA	Die Konzentration und Reinheit der DNA überprüfen. Die Zugabe von zu hohen Mengen an DNA zu den PCR-Reaktionen kann zu verschmierten Gelbildern führen. Es ist möglich, dass die DNA degradiert oder nicht rein genug ist. Neue DNA-Probe verwenden.
Schwache Amplifikation	Problem mit der DNA-Konzentration	Überprüfen, dass die DNA-Konzentration weder zu hoch noch zu niedrig ist. Sollkonzentration: 50 - 100 ng DNA pro Reaktion, in 10 µl.
	Probleme mit dem Thermocycler	Bitte unbedingt die Anweisungen des Herstellers zur Wartung und Kalibrierung des Thermocyclers befolgen. Überprüfen, dass die PCR-Parameter gemäß der Gebrauchsanweisung richtig sind.
	Gelfehler	Sicherstellen, dass in jede Vertiefung dasselbe Volumen an Reaktionsprodukt gegeben wurde, d. h. zwischen 5 µl und 10 µl. Die Pipetten gemäß den Anweisungen des Herstellers kalibrieren. Frische Ethidiumbromid-Lösung verwenden.
Unspezifische Amplifikation	Problem mit der DNA-Konzentration	Überprüfen, dass die DNA-Konzentration weder zu hoch noch zu niedrig ist. Sollkonzentration: 50 - 100 ng DNA pro Reaktion, in 10 µl.
	Reaktionen wurden in der falschen Reihenfolge geladen	Anordnung der PCR- und Gelspuren überprüfen. Ein Überlaufen aus den benachbarten Vertiefungen bei der Elektrophorese vermeiden, indem die Vertiefungen nicht überladen werden und sichergestellt wird, dass das Gel erstarrt ist, bevor die Kämme entfernt werden.

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Lösung
	Neues Allel wurde identifiziert	Zuvor nicht sequenzierte Allele können mit einem neuen Amplifikationsmuster vorhanden sein. Bei Verwendung von alten Interpretationsblättern ein aktuelleres Alignment-Update von www.biofortuna.com herunterladen. Wenn das neue Muster hierdurch nicht interpretiert werden kann, sollten Sie mit einem anderen Biofortuna Kit eine erneute Überprüfung durchführen oder versuchen, die Sequenz mittels sequenzbasierter Typisierung zu identifizieren.
Amplifikationsmuster kann nicht interpretiert werden	Ein Artefakt wurde fälschlicherweise als spezifische Bande interpretiert	Entnehmen Sie die richtige Bandengröße den spezifischen Interpretationstabellen. Überprüfen, ob alle spezifischen Amplifikationen die richtige Größe aufweisen oder ob ein Artefakt (Verschleppung, Primer-Dimer) fälschlicherweise als Amplifikation interpretiert wurde.
	Reaktionen wurden in der falschen Reihenfolge geladen	Anordnung der PCR- und Gelspuren überprüfen.
	Eine einzelne PCR ist fehlgeschlagen	Überprüfen, ob alle internen positiven Kontrollen vorhanden sind. Wenn keine Reaktionen fehlen, erneut interpretieren.
	Keine kleinen Amplifikate vorhanden	Wird die Elektrophorese zu lange durchgeführt, wandern kleine Amplifikate aus dem Gel heraus oder an der Ethidiumbromid-Front vorbei, oder sie werden beim Eintritt in die vorherige Gelvertiefung zerstreut. Die für Ihr Gelsystem geeigneten Elektrophoresebedingungen verwenden.
	In der Probe wurde ein neues Allel identifiziert	Gelegentlich können neue Allele entdeckt werden, die auf ein Amplifikationsmuster schließen lassen, das keinen/m bestehenden Allel(en) entspricht. Bitte wenden Sie sich diesbezüglich an Ihren zuständigen Kundendienst.

14. Änderungsübersicht

Änderung: **Von Version 4 zu Revision 5**

Änderungsdatum: **21. Januar 2014**

Abschnitt	**Änderungsbeschreibung**
Abschnitt 4: Inhalt des Kits	Hinzufügen der Abdichtungsfolien für Platten in Kits
Abschnitt 5: **Nicht mitgelieferte Reagenzien und Laborausstattung**	Korrektur: 96 Vertiefungen, Thermocycler-Spezifikationen hinzugefügt
	Lagerungsbedingungen für Kit zu 2 – 28 °C aktualisiert
	Der Umgang mit nicht hydrierten PCR-Platten und -Streifen
	Der Umgang mit hydrierten PCR-Platten und -Streifen
Abschnitt 8: **Anweisungen zur Verwendung**	Verdünnen von DNA in sterilem, hochreinem Wasser
	Hinzufügen von Störsubstanzen und DNA-Reinheitsleitlinien
	$A_{260/280}$ Messung aktualisiert
	Positionieren der gefriergetrockneten Pellets vor dem Hinzufügen der Probe eingefügt
	Aufbewahrungsbedingungen für amplifiziertes Produkt hinzugefügt
	Hinweise zu den Gel-Elektrophoresezeiten
Abschnitt 9: Interpretation	Chargenspezifische Anmerkungen
	Die Kit-Chargennummer muss mit der Chargennummer in der Interpretationstabelle übereinstimmen.
Abschnitt 11: Klinische Daten	Neu hinzugefügter Abschnitt
Abschnitt 14: Änderungsübersicht	Neu hinzugefügter Abschnitt

15. Erläuterung der verwendeten Symbole

Anzahl der Tests

Bevollmächtigter (EG)

Gebrauchsanleitung beachten

Herstellungsort

In-vitro-Diagnostikum

Verfallsdatum

Lagertemperatur

Chargenbezeichnung

Vertrieb durch

Global Trade Item Number

16. Kontaktinformationen des Herstellers

Biofortuna Ltd
1 Hawkshead Road
Croft Business Park
Bromborough, CH62 3RJ, UK
T: +44 (0) 151 334 0182
E: info@biofortuna.com
W: www.biofortuna.com

17. Übersetzungen

FranÇaise:	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
České:	Překlady k dispozici
Danske:	Tilgængelige oversættelser
Έλληνες:	διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítások
Norske:	Oversettelser tilgjengelig
Polska:	Dostępne tłumaczenia
Português:	Traduções disponíveis
Россию:	Переводы доступны
Slovenskému:	Preklady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com